Sanquin Reagents
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands

Phone: 31.20.512.3599
Fax: 31.20.512.3570
reagents@sanquin.nl
www.sanquinreagents.com



Réservé à l'usage professionnel

No. 060 010112

Cellbind Screen   REF K7000   CE

Test sur micro-colonne pour la détection ou l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires et pour les groupages sanguins

Informations générales

Cellbind Screen est un test sur micro-colonne dans lequel les érythrocytes sensibilisés d'une suspension sont capturés par une matrice de gel contenant des anti-IgG, des anti-IgM et des anti-C3d dans un milieu optimisé haute densité. Chaque carte test est composée de six micro-colonnes contenant le gel dans le milieu haute densité. Cellbind Screen est destiné à la détection ou l'identification des anticorps érythrocytaires ainsi que les groupages sanguins, pour les tests de compatibilité et le test de Coombs direct modifié (TDA, pour la détection des antigènes *in vivo* des érythrocytes par des anticorps et des composants du complément). Cellbind Screen peut être utilisé manuellement ou avec des systèmes semi-automatisés ou automatisés. Le test Cellbind Screen est conforme aux normes et directives en vigueur. Les spécifications des performances du test sont indiquées dans les publications fournies avec le produit sur demande. Le test repose sur l'immunofixation d'érythrocytes sensibilisés dans une micro-colonne contenant du gel comme matrice. La suspension cellulaire est ajoutée dans la chambre d'incubation de la micro-colonne en même temps que le plasma, le sérum ou le sang à tester. Au cours de la phase d'incubation, les antigènes érythrocytaires se lient spécifiquement aux anticorps anti-érythrocytaires présents dans le plasma, le sérum ou le réactif. Ensuite, les cartes sont soumises à trois phases de centrifugation. Au cours de la première phase, le milieu haute densité sépare les érythrocytes du plasma, du sérum ou du réactif. Au cours de la seconde phase, les érythrocytes sensibilisés s'agglutinent et sont capturés dans la partie supérieure du gel de la matrice de la micro-colonne, alors qu'au cours de la troisième phase, les érythrocytes non sensibilisés ou faiblement sensibilisés migrent vers le bas de la micro-colonne. L'inclusion de contrôles positifs et négatifs dans chaque série de test de groupage sanguin est fortement recommandée.

Précautions

Usage *in vitro* uniquement. Les cartes Cellbind Screen doivent être conservées en position verticale entre 2–8°C. Dans le cas contraire, les maintenir en position verticale pendant environ 15 minutes avant utilisation, afin de permettre au gel de la matrice de se redéposer. Dans la plupart des cas, il est possible d'éliminer les bulles d'air introduites lors du transport dans le milieu haute densité ou le gel de la matrice en centrifugeant les cartes Cellbind Screen non ouvertes dans la centrifugeuse Cellbind avant utilisation. Les cartes Cellbind Screen ne doivent pas être utilisées au-delà de la date de péremption imprimée sur leur étiquette. Une fois les résultats lus, les cartes peuvent être recouvertes et conservées en position verticale entre 2–8°C pendant une semaine. Une solution de chloramphénicol à <0,1% est utilisé comme conservateur. Les réactifs ne peuvent être garantis exempts d'agents infectieux. Il convient d'agir avec précaution lors de la manipulation et de l'élimination des conteneurs et de leur contenu. Au terme du test, l'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux directives du laboratoire.

Recueil et préparation des échantillons

Echantillon:

Les échantillons de sang doivent être obtenus aseptiquement, avec ou sans ajout d'anticoagulants. Il est fortement conseillé de centrifuger les tubes de sang pendant 5 minutes à 3000g avant tout prélèvement d'échantillons de sérum ou de plasma. Le prélèvement d'échantillons de sérum ou de plasma doit être effectué à la pipette et non pas en versant le plasma ou le sérum. Les échantillons de plasma ou de sérum doivent rester exempts de leucocytes, de fragments de gel et/ou de résidus de fibrine afin d'éviter le blocage du gel de la matrice. Pour la détection ou l'identification des anticorps érythrocytaires, il est conseillé d'utiliser du plasma ou du sérum frais (48 heures maximum après le prélèvement). Les échantillons de sérum ou de plasma non testés immédiatement peuvent être conservés pendant 48 heures entre 2–8°C ou à <-18°C au delà. Il est conseillé de centrifuger les échantillons de sérum ou de plasma décongelés pendant 5 minutes à 3000g avant tout test afin d'éliminer tout précipité. Utiliser du sang frais pour le test de Coombs direct modifié. Le sang frais doit être de préférence plongé dans de l'EDTA afin d'éviter la sensibilisation *in vitro* des érythrocytes par les composés du complément. Le plasma ne convient pas pour la détection d'anticorps fixant le complément car les anticoagulants inhibent l'activation du complément.

Réactifs:
Cellbind Screen (REF K7000): Boîte contenant 48 cartes de 6 micro-colonnes.
Cellbind LISS, 250 ml (REF K7100), 100 ml (REF K7110): milieu d'incubation pour la préparation les suspensions d'érythrocytes à 0,5%.
Cellbind P2, 2 x 10 ml (REF K7200): suspension d'hématies test à 0,5% pour la détection d'anticorps érythrocytaires.
Cellbind P3, 3 x 10 ml (REF K7210): suspension d'hématies test à 0,5% pour la détection d'anticorps des érythrocytaires.
Cellbind P3-P (papaïn), 3 x 10 ml (REF K7211): suspension d'hématies test à 0,5% papaïnées pour la détection d'anticorps des érythrocytaires. Cellbind ID16, 16 x 3 ml (REF K7230): suspension d'hématies test à 0,5% pour l'identification des anticorps érythrocytaires.
Cellbind ID16-P (papaïn), 16 x 3 ml (REF K7231): suspension d'hématies test à 0,5% papaïnées pour l'identification d'anticorps érythrocytaires.

Matériel:
Centrifugeuse Cellbind (REF K7302)
Rotor Cellbind (REF K7303)
Incubateur Cellbind (REF K7304)
Distributeur Cellbind (REF K7300)
Station de travail Cellbind (REF K7301)

Suspensions d'érythrocytes:
Pour la détection ou l'identification des anticorps, il est conseillé d'utiliser la suspension prête à l'emploi d'hématies test Cellbind à 0,5% i. Si un autre panel de cellules est utilisé, il est nécessaire de préparer une suspension à 0,5% dans la solution Cellbind LISS selon le mode préparatoire ci-dessous. Remarque: Ce protocole applicable uniquement aux cellules non traitées par des enzymes. S'il est nécessaire d'effectuer des tests avec des cellules traitées par des enzymes, il faut utiliser Cellbind P3-P (REF K7211) ou Cellbind ID16-P (REF K7231).
Pour l'autocontrôle et pour le test de Coombs direct modifié, il est nécessaire de préparer une suspension à 0,5% d' érythrocytes du patient dans la solution Cellbind LISS. Il en va de même pour les érythrocytes du donneur ou du patient pour la détermination du groupe sanguin et les tests de compatibilité.

Préparation de la suspension d'érythrocytes à 0,5%:
11 µl de culot globulaire + 2ml de solution Cellbind LISS ou
200 µl d'hématies tests à 3% + 1 ml de solution Cellbind LISS

Procédure d'utilisation de la centrifugeuse Cellbind
Pour utiliser la centrifugeuse Hettich avec les cartes Cellbind, procéder comme suit:
1. Insérer le rotor Cellbind conformément aux instructions du manuel d'utilisation Hettich.
2. La centrifugeuse reconnaît le rotor et se programme automatiquement en fonction du protocole Cellbind.
3. Pour l'étape de centrifugation mentionnée dans la procédure de test suivante, il suffit de presser «start» (Démarrage). La centrifugeuse effectue les trois étapes suivantes:
   - 0–2 minutes 75 fcr 780 tm
   - 2–3 minutes 200 fcr 1280 tm
   - 3–10 minutes 1790 fcr 3840 tm
4. A la fin de la centrifugation, il est possible d'ouvrir le couvercle et de retirer les cartes.

Procédure de test
Ramener tous les réactifs à température ambiante (18–25°C). Ne pas utiliser des cartes Cellbind Screen dont la matrice de gel présente des bulles d'air, dont les fermetures sont rompues ou qui présentent des signes de dessèchement (absence de liquide ou niveau de liquide irrégulier au-dessus de la matrice de gel).

Détection ou identification des anticorps
1. Retirer la bande de protection des colonnes à utiliser
2. Déposer 40–50 µL desuspension d'hématies test à 0,5% dans la chambre d'incubation.
3. Déposer le même volume (40–50 µL) de plasma ou de sérum dans la chambre d'incubation.
4. Incuber à 37°C pendant 15 minutes dans l'incubateur Cellbind.
5. Insérer les cartes dans la centrifugeuse Cellbind (10 minutes). Les paramètres de centrifugation sont déjà programmés.
6. Effectuer la lecture des réactions.

Typage des antigènes de groupe sanguin

1. Retirer la bande de protection des colonnes à utiliser.
2. Déposer 40–50 µL de la suspension d'hématies test à 0,5% dans la chambre d’incubation.
3. Déposer 20 µL de réactif Sanquin pour la détermination des groupes sanguins dans la chambre d’incubation. Remarque: Une liste de réactifs validés de Sanquin pour la détermination des groupes sanguins est disponible sur demande. L'utilisation de tout autre réactif de typage peut produire des résultats aberrants et doit donc être validée par l'utilisateur.
4. Insérer les cartes dans la centrifugeuse Cellbind (10 minutes). Les paramètres de centrifugation sont déjà programmés.
5. Effectuer la lecture des réactions.

Test de Coombs direct (TDA) modifié

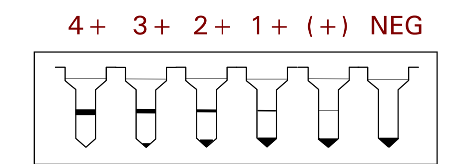
1. Retirer la bande de protection des colonnes à utiliser.
2. Déposer une goutte (40–50 µL) de la suspension à 0,5% d'érythrocytes du patient dans la chambre d'incubation.
3. Insérer les cartes dans la centrifugeuse Cellbind (10 minutes). Les paramètres de centrifugation sont déjà programmés.
4. Effectuer la lecture des réactions.

Test de compatibilité

1. Retirer la bande de protection des colonnes à utiliser.
2. Déposer 40–50 µL de la suspension d'érythrocytes à 0,5% du donneur dans la chambre d'incubation.
3. Déposer le même volume (40–50 µL) de plasma ou de sérum du patient dans la chambre d'incubation.
4. Incuber à 37°C pendant 15 minutes dans l'incubateur Cellbind.
5. Insérer les cartes dans la centrifugeuse Cellbind (10 minutes). Les paramètres de centrifugation sont déjà programmés.
6. Effectuer la lecture des réactions.

Interprétation

En cas de réaction positive, les érythrocytes sont capturés dans la partie supérieure du gel de la matrice. En cas de réaction négative, seul un petit culot d’érythrocytes apparaît au fond de la micro-colonne. Les profils réactionnels sont décrits ci-dessous:



Le nombre d'érythrocytes capturés dans la partie supérieure du gel de la matrice dépend de paramètres tels que la densité antigénique des érythrocytes ainsi que du titre et de l'affinité de l'anticorps. Il dépend également de la durée de la seconde phase de centrifugation ainsi que de la force centrifugation de la troisième phase.
En conséquence, si une réaction est inférieure à 4+, des cellules apparaissent également au fond de la micro-colonne. Les réactions de double population présentent le même profil réactionnel.

Détection ou identification des anticorps

Les réactions positives indiquent la présence d'anticorps érythrocytaires dans le plasma ou le sérum. Les réactions négatives indiquent l'absence d'anticorps érythrocytaires. Un auto-contrôle positif peut traduire la présence d'auto-anticorps.

Typage des antigènes de groupe sanguin

Les réactions positives avec les réactifs de détermination des groupes sanguins traduisent la présence des antigènes correspondants sur les érythrocytes. Les réactions négatives avec les réactifs de détermination des groupes sanguins indiquent que la présence d’ antigènes correspondants sur les érythrocytes est indétectable.

Test de Coombs direct (TDA) modifié

Les réactions positives indiquent la sensibilisation *in vivo* des érythrocytes avec des anticorps et/ou des composés du complément.

Test de compatibilité

Les réactions positives indiquent l'incompatibilité du donneur de sang avec le receveur. Les réactions négatives indiquent la compatibilité du donneur de sang avec le receveur.

Limites du test

Résultats positifs inattendus: pseudo-agglutination, auto-agglutination, réaction de double population, certains médicaments, concentration d'érythrocytes trop élevée, érythrocytes sensibilisés *in vivo* avec des anticorps et/ou des composés du complément.
Résultats négatifs ou faibles inattendus: faibles réponses des antigènes, réaction de double population ou activité réduite des réactifs. Il existe un risque d'obtenir de faux résultats positifs ou négatifs suite à une la présence de bulles d'air dans la matrice de gel, contamination du matériel du test ou à une déviation quelconque par rapport aux techniques recommandées.
En cas d'utilisation d'échantillons dont le taux d'hémolyse est élevé, des réactions non spécifiques peuvent se produire. Si l'échantillon contient des résidus de fibrine, cela peut entraîner la capture de cellules non sensibilisées au cours de la centrifugation, se traduisant par la formation d'une ligne fine et rouge dans la partie supérieure du gel de la matrice.

Références

1. Race R.R. and Sanger R.; Blood Groups in Man, 6th ed. Oxford Blackwell Scientific Publishers 1975.
2. Issit P.D.; Applied Blood Group Serology 3rd ed. Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1985.
3. Daniels G.; Human Blood Groups. Blackwell Science Ltd. 1995.
4. Mollison P.L. et al.; Blood Transfusion In Clinical Medicine, 9th ed. Blackwell, Oxford, 1993.